

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 04300838

PUBLICATION DATE : 23-10-92

APPLICATION DATE : 28-03-91

APPLICATION NUMBER : 03089958

APPLICANT : TERUMO CORP;

INVENTOR : GOTO HIROSHI;

INT.CL. : A61K 37/14 A61K 9/127

TITLE : ARTIFICIAL ERYTHROCYTE AND ITS SUSPENSION

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain artificial erythrocytes, prevented from agglutination even in living bodies and thereby having sufficient oxygen transportation ability and an artificial erythrocytic suspension, having high fluidity and enabling efficient oxygen transportation.

CONSTITUTION: Artificial erythrocytes which are a liposome composed of a lipid membrane, modified with an agglutination inhibitor having a hydrophobia part at one terminal and a hydrophilic polymeric chain part at the other terminal and incorporating a mixed aqueous solution of hemoglobin and an allosteric effector in the interior. The hydrophobic part of the aforementioned agglutination inhibitor is fixed on the membrane surface and the hydrophilic polymeric chain part extends in the outward direction. A value obtained by dividing the weight of a liposome membrane constituent lipid by the weight of hemoglobin is 0.40-1.67. Furthermore, an artificial erythrocytic suspension which is a suspension prepared by suspending the artificial erythrocytes in a liquid carrier having biocompatibility. The above-mentioned suspension is regulated to 5-15 (wt./vol.)% hemoglobin concentration and 1-4 cP viscosity at 383sec⁻¹ shearing rate and 37°C.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-300838

(43) 公開日 平成4年(1992)10月23日

(51) Int.Cl. ⁵ A 61 K 37/14 9/127	識別記号 ABZ	序内整理番号 8314-4C	F I	技術表示箇所
	L	7329-4C		
	D	7329-4C		

審査請求 未請求 請求項の数5(全7頁)

(21) 出願番号 特願平3-89958	(71) 出願人 000109543 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
(22) 出願日 平成3年(1991)3月28日	(72) 発明者 鈴木 一比好 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地テ ルモ株式会社内 (72) 発明者 坂口 圭介 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地テ ルモ株式会社内 (72) 発明者 緒方 嘉貴 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地テ ルモ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工赤血球および人工赤血球懸濁液

(57) 【要約】

【目的】 生体内において凝集が防止され、従って十分な酸素運搬能力を有する人工赤血球、および高い流動性を有し、酸素運搬が効率よく行えることを可能とする人工赤血球懸濁液を提供すること。

【構成】 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する凝集抑制剤によって修飾され、内部にヘモグロビンとアロステリックエフェクターとの混合水溶液をとりこんでなる脂質膜から構成されたリポソームであって、前記凝集抑制剤の疎水性部が膜表面に固定されるとともに、前記親水性高分子鎖部が外方向に伸びてなり、かつ前記リポソーム膜構成脂質量をヘモグロビン重量で除した値が0.40～1.67であることを特徴とする人工赤血球、および前記人工赤血球が生体適合性を有する液体担体中に懸濁された懸濁液であって、ヘモグロビン濃度が5～15(W/V)%、ずり速度383second⁻¹、37℃のときの粘度が1～4cPに調整されていることを特徴とする人工赤血球懸濁液。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する凝集抑制剤によって修飾され、内部にヘモグロビンとアロステリックエフェクターとの混合水溶液をとりこんでなる脂質膜から構成されたリポソームであって、前記凝集抑制剤の疎水性部が膜表面に固定されるとともに、前記親水性高分子鎖部が外方向に伸びてなり、かつ前記リポソーム膜構成脂質重量をヘモグロビン重量で除した値が0.40～1.67であることを特徴とする人工赤血球。

【請求項2】前記アロステリックエフェクターは、イノシットヘキサリン酸である請求項1記載の人工赤血球。

【請求項3】前記リポソームの脂質膜が水素添加率50%以上の水素添加リン脂質にて形成され、かつ当該脂質膜中には抗酸化剤を含有せしめてなる請求項2記載の人工赤血球。

【請求項4】前記抗酸化剤はビタミンEである請求項3記載の人工赤血球。

【請求項5】請求項1～4のいずれかに記載の人工赤血球が生体適合性を有する液体担体中に懸濁された懸濁液であって、ヘモグロビン濃度が5～15(W/V)%、およびずり速度383second⁻¹、37℃のときの粘度が1～4cPに調整されていることを特徴とする人工赤血球懸濁液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は人工赤血球に関する。さらに本発明は、血漿中における凝集が好適に抑制され、高い酸素運搬能力を発揮する人工赤血球、および当該人工赤血球を含有する人工赤血球懸濁液に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、人工酸素運搬体としては、フルオロカーボン乳化液を使用する試みが広く行われている。しかしながら、フルオロカーボン乳化液は、酸素運搬能力が低く、実際の使用に際しては、高圧酸素付加の条件下で行われるものであり、操作が煩雑ばかりでなく、過度の酸素化による障害が懸念されるものであった。

【0003】これに対して天然赤血球由來のヘモグロビンを利用する方法は、酸素運搬能力については有利であるが、赤血球膜除去ヘモグロビンを製造する際に、赤血球中の2,3-ビスホスホグリセレートが失われるため、低酸素分圧下において酸素を放出し難く、組織に酸素を十分供給できないという欠点があった。これらの欠点を解決するために、ヘモグロビンをピリドキシル化して酸素運搬能力を高める試みもあるが、十分な効果を有するものではなかった。また赤血球中のヘモグロビンとアロステリックエフェクターとを結合させて酸素運搬能力を高めた人工血液が開示されているが、赤血球自体を使用しているため、輸血を行なう際にその適合性が問題であった。

【0004】これらの課題を解決するために、本願出願人は、先に、アロステリックエフェクターを溶解させたヘモグロビン溶液をリポソーム内に取り込んでなる人工赤血球を開示している(特開昭64-61426号)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記人工赤血球は、生体外においては十分な酸素運搬能力を有するが、生体血管に投与した際に、血液中の蛋白質を介してリポソーム同士が凝集すると実効酸素運搬能力が低下してしまうという問題点があった。また、人工赤血球懸濁液の粘度が高い場合には、生体血管内で循環不良を生ずるので、リポソームの凝集を惹起するとともに、酸素運搬が効率よく行われないという問題があった。従つて本発明は、生体内においても凝集が防止され、従つて十分な酸素運搬能力を有する人工赤血球、および高い流動性を有し、酸素運搬が効率よく行えることを可能とする人工赤血球懸濁液を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記の課題は、以下に示す人工赤血球および人工赤血球懸濁液によって解決される。

(1) 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する凝集抑制剤によって修飾され、内部にヘモグロビンとアロステリックエフェクターとの混合水溶液をとりこんでなる脂質膜から構成されたリポソームであって、前記凝集抑制剤の疎水性部が膜表面に固定されるとともに、前記親水性高分子鎖部が外方向に伸びてなり、かつ前記リポソーム膜構成脂質重量を内部水溶液の溶質重量で除した値が0.40～1.67であることを特徴とする人工赤血球。

(2) 前記アロステリックエフェクターは、イノシットヘキサリン酸である前記1記載の人工赤血球。

(3) 前記リポソームの脂質膜が水素添加率50%以上の水素添加リン脂質にて形成され、かつ当該脂質膜中には抗酸化剤を含有せしめてなる前記2記載の人工赤血球。

(4) 前記抗酸化剤はビタミンEである前記3記載の人工赤血球。

(5) 前記1～4のいずれかに記載の人工赤血球が生体適合性のある液体担体中に懸濁された懸濁液であって、ヘモグロビン濃度が5～15(W/V)%、およびずり速度383second⁻¹、37℃のときの粘度が1～4cPである人工懸濁液。

【0007】しかして、本発明の人工赤血球は、一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する凝集抑制剤によって修飾され、内部にヘモグロビンとアロステリックエフェクターとの混合水溶液をとりこんでなる脂質膜から構成されたリポソームであって、前記凝集抑制剤の疎水性部が膜表面に固定されるとともに、前記親水性高分子鎖部が外方向に伸びてなり、かつ前記リ

3

ポソーム膜構成脂質重量をヘモグロビン重量で除した値が0.40~1.67であることを特徴とするものである。

【0008】本発明におけるリポソーム膜形成脂質は特に制限はなく、リポソームを形成するものであれば天然または合成の脂質が使用可能であるが、特に飽和のリン脂質が好適に使用される。その例としては、レシチン(ホスファチジルコリン)、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイシノトール、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン等を常法に従って水素添加したものが挙げられ、これらを組み合わせて用いることもできる。特に、水素添加率が50%以上とされた、卵黄あるいは大豆由来の水素添加天然リン脂質が好ましい。

【0009】本発明の人工赤血球においては、所望により、膜構成脂質中にビタミンE等の抗酸化剤が添加されていてもよい。ビタミンEとしては、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、またはトコフェロール誘導体(トコフェロールエステル、トコフェロールエーテル)が使用できるが、特に1- α -トコフェロール、d1- α -トコフェロール、1- α -トコフェロール酢酸、d1- α -トコフェロール酢酸が好ましい。

【0010】また、さらに膜安定化剤としてコレステロール、コレステノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加してもよい。

【0011】本発明において、リポソームに内包されるヘモグロビン水溶液は、常法に従って赤血球を溶血させ、膜成分を除去したストローマフリーへモグロビン溶液を使用することができる。

【0012】ヘモグロビン水溶液の濃度および粘度としては、濃度が30~60(W/V)%、粘度は1.0~3.000cP(4°C)であることが望まれる。上記のような濃度および粘度を有するヘモグロビン水溶液をリポソーム化することにより、人工赤血球懸濁液の粘性を高めることなく、懸濁液中のヘモグロビン濃度を、天然血液と同等の1.5重量%程度とすることができます。

【0013】本発明においては、ヘモグロビン水溶液に酸素運搬効率を増強させるためのアロステリックエフェクターが含有されている。アロステリックエフェクターとしては、イノシットヘキサリン酸、イノシットベンタリン酸、イノシットテトラリン酸、イノシットトリリン酸、イノシットジリン酸、ジホスファチジルジリン酸等の糖フォスフェート、ヌクレオチドトリ fosfate、ヌクレオチドジfosfate、ヌクレオチドモノfosfate、アルコールfosfate、ポリカルボン酸等の有機アニオン、ヘキサシアノ鉄酸塩、クロリド等の無機アニオンを使用することができ、またはこれらを組み合わせて使用することもできる。これらのアロステリックエフェクタ

ーのうち、増強効果、保存安定性、安全性等の点から、特にイノシットヘキサリン酸が好ましい。水溶液中のイノシットヘキサリン酸の含有量としては、ヘモグロビン1モルに対して、0.8~2.0モルが好ましい。

【0014】次に凝集抑制剤について説明する。

【0015】本発明において、凝集抑制剤を構成する疎水性部としては、長鎖脂肪族アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキルまたはグリセリン脂肪酸エステルのアルコール性残基、およびリン脂質があげられる。親水性高分子鎖部としては、ポリエチレングリコールがあげられる。

【0016】本発明における凝集抑制剤としては、特に、ポリエチレングリコール(以下、PEGという)と、上記疎水性部アルコール性残基とがエーテル結合したPEG付加型非イオン界面活性剤、またはPEGとリン脂質とが共有結合したPEG結合リン脂質が好ましい。

【0017】PEG結合リン脂質は、水素添加リン脂質の親水部にポリエチレングリコール(PEG)を共有結合させた構造を有し、1分子中に1又は複数のPEG鎖を含有する。PEG鎖のリン脂質と結合していない側の末端は、水酸基あるいはメチル、エチル等の短鎖のエーテル、酢酸、乳酸等の短鎖のエステルであってもよい。

【0018】ここで、天然リン脂質としては、大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルエタノールアミン等を用いることが好ましい。

【0019】本発明の目的のためには、PEG結合天然リン脂質分子中のPEG鎖長は、平均重合度で5~100モルが望ましく、より望ましくは40~200モルである。この範囲を下まわる場合には、ヘモグロビン内包リポソーム(人工赤血球)の凝集抑制効果が発現され難く、この範囲を上まわる場合にはPEG結合天然リン脂質の水溶性が高くなり、リポソーム膜中に固定され難くなる。

【0020】PEGとリン脂質を共有結合するには、リン脂質の極性部に反応活性を有する官能基が必要である。この官能基としては、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基、ホスファチジルグリセロールの水酸基、ホスファチジルセリンのカルボキシル基等があり、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基が好ましく利用される。

【0021】リン脂質の官能基とPEGを共有結合させるには、塩化シアヌルを用いる方法、カルボジイミドを用いる方法、酸無水物を用いる方法、グルタルアルデヒドを用いる方法等がある。ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とPEGとを結合させるには、塩化シアヌル(2,4,6-トリクロロ-s-トリアシン)を用いる方法が好ましい。例えば、モノメトキシポリエチレングリコールと塩化シアヌルを公知の反応操作で結合させることにより、2-O-メトキシポリエチレングリコ

5

ル - 4,6 - ジクロロ - s - トリアジン (活性化PEG 1) または 2,4 - ビス (O - メトキシポリエチレンゴール) - 6 - クロロ - s - トリアジン (活性化PEG 2) が得られる。これらとアミノ基を脱塩酸縮合反応により結合させることで、ホスファチジルエタノールアミンの極性頭部にPEGを共有結合させたリン脂質が得られる。ここで、活性化PEG 1を用いた場合には、一分子中のリン脂質に1本のPEG鎖を、活性化PEG 2を用いた場合には、2本のPEG鎖を含有することになる。また、モノメトキシPEGと無水コハク酸を反応させてPEG末端にカルボキシル基を導入し、これとホスファチジルエタノールアミンをカルボジイミド存在下で反応させることにより、アミド結合を介したPEG結合天然リン脂質が得られる。

【0022】また、本発明の人工赤血球においては、リポソーム膜構成脂質重量 (L) を内部水溶液の溶質重量 (H) で除した値 (L/H) が 0.40 ~ 1.67、より好ましくは 0.50 ~ 1.00 に調整されている。この値が 0.40 より大きいと、膜脂質がヘモグロビンの漏出の虞れのない十分な厚さになり、1.67 より小さいと脂質の投与量が減少し、また人工赤血球懸濁液の粘性も小さくなるので、人工赤血球が適度に分散してなり、従って、人工赤血球同士の凝集がさらに抑制され、高い酸素運搬能力を発現することができる。

【0023】本発明の人工赤血球の平均外径は、180 ~ 300 nm であり、より好ましくは 180 ~ 250 nm である。人工赤血球の外径が 180 nm より小さく、エネルギー的に不安定な微粒子が融合を起こして、数ミクロンから数十ミクロンの大きな粒子を形成しやすい。また 300 nm より大きいと、血管内に投与した場合に毛細血管を閉塞させる虞れがある。

【0024】上記のような平均粒径および L/H 値を有し、かつPEG結合型天然リン脂質を脂質層に固定した人工赤血球を形成するには、PEG結合天然リン脂質をリポソーム形成脂質と予め均一に混合して、これをヘモグロビンとアロステリックエフェクターとを含有する混合水溶液に高速攪拌により懸濁させ、該懸濁液を高圧吐出処理することによって製造される。この際、高速攪拌時の処理条件を調整して、平均粒径が 180 ~ 300 nm なるまで攪拌を行うことにより、L/H 値を上記の範囲に調整することが可能である。また、リポソーム形成脂質とPEG結合天然リン脂質の混合比は、主成分であるリン脂質に対して、モル比で 0.1 ~ 50 モル%、好ましくは 0.5 ~ 20 モル%、より好ましくは 1 ~ 5 モル% とされる。この範囲を下まわる場合には、凝集抑制効果が不十分となり、この範囲を上まわる場合には、PEG結合天然リン脂質の可溶化能により、リポソームの膜構造が不安定となる。

【0025】また、攪拌後に、人工赤血球懸濁液にヒドロキシエチルスターーチ等の人工赤血球凝集剤を加え遠心

6

することにより、リポソーム化されなかったヘモグロビン、およびエネルギー的に不安定な微小リポソームを分離、除去することが好ましい。このように凝集剤を添加することにより、比較的低遠心力で分離、除去を行うことができる。

【0026】リポソーム膜中におけるPEG結合天然リン脂質の存在状態は明らかではないが、PEG結合天然リン脂質の疎水性部がリポソーム膜中の疎水性領域内にあって、親水性のPEG鎖が親水性領域から膜外の水性媒体中にかけて存在しているものと推定される。

【0027】次に、本発明の人工赤血球懸濁液について説明する。

【0028】本発明の人工赤血球懸濁液は、前記の人工赤血球が生体適合性を有する液体担体中に懸濁された懸濁液であって、ヘモグロビン濃度が 5 ~ 15 (W/V) %、およびずり速度 383 second⁻¹、37℃のときの粘度が 1 ~ 4 cP に調整されていることを特徴とするものである。

【0029】本発明の人工赤血球懸濁液に採用される液体担体としては、生体適合性を有する液体が好ましく、具体的には生理食塩水が好適である。

【0030】ここで、ヘモグロビン濃度が 5 ~ 15 (W/V) % であれば、十分な酸素運搬能力を有し、さらに粘度が 1 ~ 4 cP であれば、十分な流動性を有するので静注投与が容易であり、しかも人工赤血球が適度に分散して存在するので優れた酸素運搬能力を発揮するものである。なお、これらのヘモグロビン濃度、および粘度は、前述の人工赤血球を液体担体に懸濁させ、懸濁液を濾過して濃縮する際に調整することができる。

【0031】さらに、本発明の人工赤血球懸濁液においては、その晶質浸透圧が、健常人に投与することにより、生体に対して危害を及ぼすさない程度、具体的には天然赤血球を溶血させない程度の晶質浸透圧に調整されていることが望ましい。天然の血液においても、晶質浸透圧は一定ではなく、また固体差もあるが、具体的には 250 ~ 350 mOsm/l、より好ましくは 280 ~ 310 mOsm/l の範囲で選択される。

【0032】また、膠質浸透圧についても、健常人に投与することにより、生体に対して危害を及ぼすさない程度に調整されていることが望ましい。すなわち、膠質浸透圧が生体の正常な膠質浸透圧に比べて低すぎる場合には、循環血液量の維持あるいは増量効果が不十分となり、また高すぎる場合には血管内への水分の流入が過剰となり、血管外の細胞が脱水状態になる虞れがある。天然の血液においても、膠質浸透圧は一定ではなく、また固体差もあるが、具体的には 10 ~ 40 mmHg、より好ましくは 15 ~ 30 mmHg の範囲で選択される。

【0033】さらに、電解質組成についても、生体の血液中の正常な電解質組成と大きく異なる場合には、生体の正常な生理機能が阻害される虞れがあるので、電解質

組成を生体血漿中の正常な電解質組成と実質的に等しく、あるいはリソゲル液、乳酸リソゲル液またはクレブスリソゲル液と実質的に等しく調整されてなることが好ましい。

【0034】なお、本発明の人工赤血球懸濁液には、所望により血漿増量剤を含有させてもよい。血漿増量剤としては、種々公知のものが用いられるが、天然の血漿蛋白を使用した場合には、エイズをはじめとする各種感染症発生の危険性や、血漿製剤の不足、あるいは経済的な問題等が危惧される。このため、人工的な代用血漿で対応できる場合には、可能な限りこれを使うことが望ましく、従って、血漿増量剤としては人工的に製造された水溶性高分子化合物を用いることが望ましい。このような水溶性高分子化合物としては、アカシアゴム、修飾ゼラチン、ポリビニルピロリドン、デキストラン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルデンプンなどが挙げられる。

【0035】このような血漿増量剤の分子量は、上記のように膠質浸透圧を投与すべき生体が許容する浸透圧に調整する必要があるために、十分大きくなければならぬ。しかしながら、血漿増量剤の分子量が大きすぎると、人工血液の粘度が高くなつて容易に静注投与できなかつたり、あるいは人工赤血球を凝集させやすいという問題がある。しかしながら、本発明の人工赤血球は、上述のように凝集抑制剤により修飾されているので、血漿増量剤水溶液においても好適に凝集が抑制される。これらの点を鑑みて、血漿増量剤の平均分子量は20,000~70,000が好ましく、より好ましくは30,000~40,000であることが望まれる。また、このような血漿増量剤の人工赤血球懸濁液中の濃度は、上述のような分子量においては、0.3~4.0μm/m¹程度が好ましい。この範囲を超える場合には、人工赤血球懸濁液の粘度が高くなつて容易に静注投与できなかつたり、人工赤血球を凝集させやすいという問題がある。また、この範囲を下まわると、膠質浸透圧を実質的に生体が許容する範囲に調整することが難しくなる種々の水溶性高分子化合物を比較すると、同程度の平均分子量においては、ヒドロキシエチルデンプンが最も人工赤血球を凝集させにくく、従つて最も生体に対する安全性が高く好ましい。

【0036】本発明の人工赤血球懸濁液を得るには、人工赤血球の懸濁液に、血漿増量剤の水溶液を添加・混合して製造してもよいし、あるいは人工赤血球の懸濁液に、血漿増量剤の原料粉末を添加・溶解して製造してもよい。この際、懸濁液に対する血漿増量剤の添加比を調整することにより、ヘモグロビン濃度、粘度、膠質浸透圧を上記の好ましい値になるように調整する。

【0037】次に実施例および比較例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

【0038】

【実施例】(実施例) 水素添加率90重量%以上の精製大豆ホスファチジルコリン(SBPC)、コレステロール(CHOL)、ミリストン酸(MA)、ビタミンE(VE)の均一混合粉末(商品名:プレソーム、日本精化、SBPC:CHOL:MA:VE=7.0:7.0:2.0:0.28(mo1))108gに等量の水溶液を加え、60℃、60分間の水和処理を行つた。この水和脂質に、後に添加するヘモグロビン1mlに対して0.8mlのイノシットヘキサリン酸を添加し、さらにヘモグロビン濃度50(W/V)%の赤血球膜除去ヘモグロビン溶液600mlを加え、5℃に冷却しながら高速攪拌機(ワーリングブレンダー、ワーリングブレンダー社製)を用いて、10,000rpmで、リボソームの平均粒径が220nmとなるまで攪拌処理を行つた。得られた処理液に、リボソーム凝集剤として、ヒドロキシエチルスターを6重量%添加した生理食塩水を加え、12000Gの遠心加速度で30分間遠心した。遠心後、デカンテーションにより上澄みを除去し、これに先程と同量のヒドロキシエチルスターを添加して、生理食塩水を加え、リボソームを再浮遊後、同様の条件で遠心した。この処理を3回繰り返した後、リボソーム沈殿物に生理食塩水を加え、再浮遊させた。このリボソーム懸濁液を0.45μmのフィルター(ミリポア社製)により濾過し、濾液を限外濾過により濃縮し、ヘモグロビン濃度5重量%のヘモグロビン内包リボソーム懸濁液1'200mlを得た。

【0039】モノメトキシポリエチレングリコール5,000(P EG5K、ユニオンカーバイド社製)100gを1,2-ジクロロエタン500mlに溶解し、さらに無水コハク酸10gとビリジン8mlを加えて、窒素気流下にて3日間沸点還流した。濾通、エバボレーション後、200mlの蒸留水に溶解し、エーテルで水相を洗浄した後、クロロホルム200mlに抽出した。エバボレーション後、エタノール400mlに溶解し、ヘキサン9lに再沈精製した。濾集、真空乾燥して片末端カルボキシPEG5Kを85.6gを得た。これを30gと、水素添加大豆ホスファチジルエタノールアミン7g、さらにジシクロヘキシルカルボジイミド1.8gを蒸留直後のクロロホルム50mlに加熱溶解し、50℃で終夜反応させた。濾通後、エバボレーションしてエタノールに溶解し、不溶物を滤去して、溶液をヘキサンに再沈した。濾集、真空乾燥して、PEC結合水素添加大豆リン脂質(HSPE-PEG5K)34gを得た。得られた凝集抑制剤をヘモグロビン濃度5重量%あたり0.1重量%となるように、前記ヘモグロビン内包リボソーム懸濁液に添加後、37℃でインキュベーションを3時間行い、リボソームの表面を凝集抑制剤で修飾したヘモグロビン内包リボソーム懸濁液(実施例)を得た。

【0040】(比較例1) 水素添加していない精製大豆ホスファチジルコリン23.3g、コレステロール1

9
 1. 7 g、ミリスチン酸 3.7 g をジクロロメタン 300 ml に溶解し、ジクロロメタンを蒸発させて除去し、残留物に、後に添加するヘモグロビン 1 mol に対して 0.8 mol のイノシットヘキサリン酸を添加し、さらにヘモグロビン濃度 5.0 (W/V) % の赤血球膜除去ヘモグロビン溶液 200 ml を加え、震盪により懸濁させた。このときの懸濁粒子の平均粒径は 850 nm であった。得られた懸濁液を実施例と同様の手法により精製し、ヘモグロビン濃度が 5 重量 % のヘモグロビン内包リポソーム懸濁液 230 ml を得た。得られたヘモグロビン内包リポソームに実施例と同様にして表面修飾を施し、ヘモグロビン内包リポソーム懸濁液（比較例 1）を得た。得られたヘモグロビン内包リポソームの平均粒径は 350 nm であった。

【0041】（比較例 2）凝集抑制剤の修飾処理を行わない以外は、実施例と同様にしてヘモグロビン内包リポソーム懸濁液（比較例 2）を得た。

【0042】（比較例 3）ヘモグロビン溶液のイノシットヘキサリン酸を添加しない以外は、実施例と同様にしてヘモグロビン内包リポソーム懸濁液（比較例 3）を得た。

【0043】（比較例 4）凝集抑制剤の修飾処理を行わない以外は、比較例 1 と同様にしてヘモグロビン内包リポソーム懸濁液（比較例 4）を得た。

【0044】（比較例 5）ヘモグロビン溶液のイノシットヘキサリン酸を添加しない以外は、比較例 1 と同様にしてヘモグロビン内包リポソーム懸濁液（比較例 5）を得た。

【0045】（比較例 6）凝集抑制剤の修飾処理およびイノシットヘキサリン酸の添加を行わない以外は比較例 1 と同様にしてヘモグロビン内包リポソーム懸濁液（比較例 6）を得た。

* 【0046】〔比較実験〕①ヘモグロビン濃度の測定
実施例、および比較例 1～6 のヘモグロビン内包リポソーム懸濁液のヘモグロビン濃度を表 1 に示す。

【0047】②L/H 比の測定
実施例、および比較例 1～6 のヘモグロビン内包リポソーム懸濁液中のリポソームの L/H 値を表 1 に示す。

【0048】③粘度の測定
実施例、および比較例 1～6 のヘモグロビン内包リポソーム懸濁液のずり速度が 383 second⁻¹、37°C のときの粘度を、E 型粘度計（東京計器社製）を使用して測定した。その結果を表 1 に示す。

【0049】④メトヘモグロビン比率の測定
実施例、および比較例 1～6 のヘモグロビン内包リポソームのメトヘモグロビン比率を、CO オキシメーター（Instrumentation Laboratory 社製）を用いて測定した。その結果を表 1 に示す。

【0050】⑤酸素運搬効率の測定
実施例、および比較例 1～6 のヘモグロビン内包リポソームの、酸素分压 40 mmHg の時の酸素飽和度、および酸素分压 100 mmHg のときの酸素飽和度を測定して、酸素運搬効率を求めた。その結果を表 1 に示す

【0051】⑥血漿中（生体外）での凝集判定。
【0052】実施例、および比較例 1～6 のヘモグロビン内包リポソーム懸濁液 0.1 ml と、クエン酸添加ヒト血漿 0.5 ml とを混合し、光学顕微鏡（400 倍）にて、1 μm を越えるリポソーム凝集物を観察した。なお、判定は以下の指標により行った。その結果を表 1 に示す

○…凝集物が多数存在する。

△…凝集物が極わずかに存在する。

×…凝集物がまったく存在しない。

* 【表 1】

表 1

懸濁液	ヘモグロビン濃度	L/H 値	粘度	メトヘモグロビン比率	酸素運搬効率	血中の様
実施例 1	7 (%)	0.73	1.8 cP	2.0 (%)	35 (%)	×
比較例 1	7	2.18	5.0	35.0	34	×
比較例 2	7	0.70	2.0	1.5	35	○
比較例 3	7	0.66	1.9	1.8	4	×
比較例 4	7	2.07	5.5	32.0	34	○
比較例 5	7	2.13	5.2	36.0	3	×
比較例 6	7	2.00	5.4	45.0	4	○

【0053】（生体内における酸素運搬能の測定および凝集判定）実施例（A 液とする）、および比較例 1～6（B～G 液とする）のヘモグロビン内包リポソーム懸濁液を使用して、生体内における酸素運搬能の経時変化を観察した。

【0054】5% 牛血清アルブミン生理食塩水により 85% 血漿交換を行ったウサギに A～G 液をそれぞれ 30 ml / Kg 投与し、経時的に抹消採血を行い、血中乳酸量の測定および酸素運搬能の観察を行った。その結果を第 2 表に示す。

11

【0055】

12

【表2】

表2

経過時間 (hours)	A液	B液	C液	D液	E液	F液	G液
乳酸量 (mg/dl)							
血漿交換前	24	24	24	24	24	24	24
0	68	68	68	68	68	68	68
1	18	25	20	120	27	125	128
2	20	30	25	132	32	136	140(死)
3	23	36	30	145(死)	38	141(死)	
6	30	45	30		45		
24	25	52	35		50		

【0056】その結果、A液を投与した例においては、血漿交換後2～3時間で正常乳酸量に回復したことを確認し、さらに25時間生存を確認した後計画屠殺した。G液を投与した例においては、約2時間後に死亡した。またD、F液を投与した例では、約3時間後に死亡した。B、C、E液を投与した例では、25時間生存を確認し、その後計画屠殺した。死亡および計画屠殺したウサギについて、病理組織学的観察を行った結果、A液投与ウサギには異常は見られなかつたが、C、E、G液投与ウサギでは、肺、腎臓、脾臓にリポソーム凝集塊が引き起こしたと推測される血管内凝固が観察された。またB、D、E、F、G液投与ウサギでは、酸素不足に起因する肝小葉中心性の空胞変性、肝小葉中心性の壊死が観察され、死亡例では特に顕著であった。

【0057】
【発明の効果】以上、詳述したように、本発明に係るリポソームは、一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する凝集抑制剤によって修飾され、内部にヘモグロビンとアロステリックエフェクターの混合水溶液をとりこんでなる脂質膜から構成されたリポソームであって、前記凝集抑制剤の疎水性部が膜表面に固定されるとともに、前記親水性高分子鎖部が外方向に伸びてなり、かつ前記リポソーム膜構成脂質重量を内部水溶液の溶質重量で除した値が0.40～1.67であることを特徴とするものであるから、生体内において極めて顕著な凝集抑制効果、および酸素運搬能を発揮し、かつ安全性に優れる効果を有するものである。

フロントページの続き

(72)発明者 後藤 博
神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地テ
ルモ株式会社内

THIS PAGE BLANK (USPTO)